

毛细管电泳-安培检测法测定3种拟肾上腺素药物

黄颖^{1*}, 张晓丽¹, 占春荣¹, 陈国南²

(1. 福建师范大学化学与材料学院, 福建 福州 350108;

2. 福州大学食品安全分析与检测教育部重点实验室, 福建 福州 350108)

摘要:建立了毛细管电泳-安培检测法测定盐酸去氧肾上腺素(phenylephrine hydrochloride, PHE)、重酒石酸间羟胺(metaraminol bitartrate, MR)和盐酸异丙肾上腺素(isoprenaline hydrochloride, IP)3种拟肾上腺素药物的方法。检测电位为0.950 V(Ag/AgCl为参比电极),硼酸盐浓度为50 mmol/L(pH 10.00),分离电压为18 kV,进样时间为10 s。在最佳实验条件下,3种物质在18 min内达到基线分离,在2~100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内峰面积与浓度呈良好的线性关系,线性相关系数不小于0.999 1。盐酸去氧肾上腺素、重酒石酸间羟胺和盐酸异丙肾上腺素的检出限分别为0.8、0.8和1.0 $\mu\text{mol/L}$ 。将所建立的方法应用于针剂样品的分析,结果令人满意。

关键词:毛细管电泳法;安培检测;拟肾上腺素药物

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2010)11-1084-05

Determination of three adrenergic drugs using capillary electrophoresis with amperometric detection

HUANG Ying^{1*}, ZHANG Xiaoli¹, ZHAN Chunrong¹, CHEN Guonan²

(1. College of Chemistry and Materials Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China;

2. Ministry of Education Key Laboratory of Analysis and Detection Technology for Food Safety, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China)

Abstract: A method for the determination of three adrenergic drugs, including phenylephrine hydrochloride (PHE), metaraminol bitartrate (MR) and isoprenaline hydrochloride (IP), was developed using capillary electrophoresis with amperometric detection. The detection potential of working electrode was 0.950 V versus the reference electrode of Ag/AgCl. At the applied voltage of 18 kV, the three analytes were completely separated within 18 min in 50 mmol/L borate buffer (pH 10.00) with the injection time of 10 s. Good linear relationships were obtained for all the three analytes in the range of 2–100 $\mu\text{mol/L}$. The detection limits for PHE, MR and IP were 0.8, 0.8 and 1.0 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The proposed method was applied to the analysis of some injection drugs, and the results were satisfactory.

Key words: capillary electrophoresis (CE); amperometric detection; adrenergic drugs

拟肾上腺素药物又称肾上腺素受体激动药,是一类化学结构、药理作用与肾上腺素、去甲肾上腺素相似的胺类药物,与肾上腺素受体结合后可激动受体,产生和肾上腺素一样的作用^[1]。其主要功能是兴奋心脏、加快心率、收缩或舒张血管等,在临床医学上有重要的应用价值。拟肾上腺素药物的测定方法主要有流动注射化学发光法^[2,3]、高效液相色谱法^[4,5]、紫外光谱法^[6]、电化学法^[7]、毛细管电泳-化

学发光检测法^[8]、芯片毛细管电泳-电化学检测法^[9]、毛细管电泳-紫外检测法^[10-17]等。其中毛细管电泳法的研究工作相当部分集中在手性分离方面^[13-17],检测的方式多为紫外检测。紫外检测为常用的检测方法,但存在检测灵敏度较低(通常为 $10^{-5} \sim 10^{-6} \text{ mol/L}$)的问题。电化学检测具有灵敏度较高的特点,适用于具有电化学活性的物质测定。程寒等^[9]采用微流控芯片电泳-电化学检测,以异丙

* 通讯联系人:黄颖,博士,教授,研究方向为毛细管电泳和电化学。Tel:(0591)83465225, E-mail:huangying@fjnu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 20877019)和福建省属高校科研专项计划项目(JK2010008)。

收稿日期:2010-07-01

肾上腺素和多巴胺为分析对象,比较了 4 种碳纤维电极的性能。本文以自组装的毛细管电泳-安培检测装置,建立了分离和检测盐酸去氧肾上腺素(phenylephrine hydrochloride, PHE)、重酒石酸间羟胺(metaraminol bitartrate, MR)、盐酸异丙肾上腺素(isoprenaline hydrochloride, IP) 3 种拟肾上腺素药物(结构式见图 1)的方法。目前有关这 3 种药物分离和检测的毛细管电泳-安培检测方法未见报道。

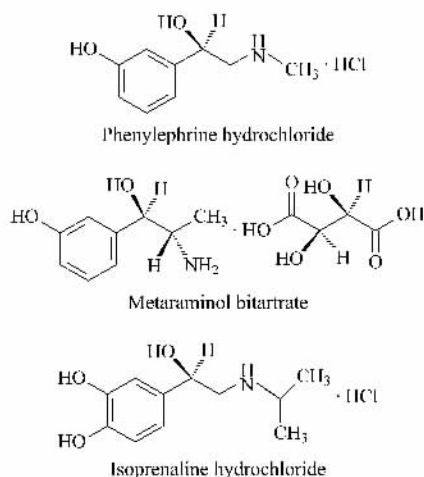


图 1 盐酸去氧肾上腺素、重酒石酸间羟胺、盐酸异丙肾上腺素的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of PHE, MR and IP

1 实验部分

1.1 仪器

自组装的毛细管电泳-安培检测装置,组件包括无级可调高压电源(0 ~ 30 kV,上海原子核研究所)、未涂层石英毛细管(65 cm × 25 μm i. d.,河北永年光纤厂)、三电极工作系统(直径 0.3 mm 的自制碳圆盘微电极、铂对电极、Ag/AgCl 参比电极)、BAS LC-4C 型安培检测器(Bioanalytical System, West Lafayette, USA)、HW-2000 色谱工作站(用于处理色谱仪信号数据;南京千谱软件有限公司)、CH1660 电化学工作站(用于循环伏安法;上海辰华仪器有限公司);PHS-3C 型精密酸度计(上海大普仪器有限公司);KQ-100 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q 超纯水系统(Millipore, Bedford, USA)

1.2 试剂

盐酸去氧肾上腺素标准品(北京恒元启天化工技术研究院)、重酒石酸间羟胺和盐酸异丙肾上腺素标准品(美国 Sigma 公司)。盐酸去氧肾上腺素和重酒石酸间羟胺注射液(上海禾丰制药有限公

司)购自回春药店;其余试剂均为分析纯。

准确称取一定量的 PHE、MR、IP 溶解在水中,配制成 10 mmol/L 储备液,放置于冰箱中冷藏备用。使用时取适量储备液混合,并用硼酸盐缓冲液稀释至所需浓度。

1.3 CE 条件和实验步骤

每天实验前,工作电极以 M5 的金相砂纸打磨 10 min,在超声洗涤器中超声洗涤 5 min,用高纯水清洗干净后,将电极插入阴极槽导向管并轻轻下压,使之刚好与毛细管出口相对。在 18 kV 电压下从毛细管阳极端进样 10 s,运行缓冲液为 50 mmol/L 硼酸盐缓冲液(pH 10.00),检测电位为 +0.950 V (vs. Ag/AgCl)。

实验过程中所有需要通过毛细管的溶液在使用前均用聚丙烯微孔滤膜(0.22 μm)过滤,并经超声波清洗器除去细小气泡,以防止堵塞毛细管。每天使用毛细管之前,依次用 0.1 mol/L NaOH 溶液和高纯水清洗各 15 min,再在 18 kV 的分离电压下用缓冲液冲洗至基线平稳。每天实验结束后,用 0.1 mol/L NaOH 溶液清洗约 20 min,再用高纯水清洗 20 min,保证毛细管放置时里面充满水。同时取下参比电极并置于饱和 KCl 溶液中浸泡。

1.4 样品测定

取适量的 PHE 和 MR 针剂,经缓冲液适当稀释后直接进样分析。进行加标回收实验时,分别取市售的 PHE 和 MR 针剂样品各 2 份,加入相应的标准物质,按同样的稀释倍数在相同条件下进行测定。

2 结果与讨论

2.1 检测电位的选择

毛细管电泳-安培检测法所测定的对象是具有电化学活性的物质,因此被测物有无电化学活性及其氧化(还原)电位对实验至关重要。首先利用循环伏安法(CV)考察了研究对象(PHE、MR、IP)的电化学活性和它们的氧化电位。以 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 10.00)为支持电解质,对浓度为 0.1 mmol/L 的 PHE、MR 和 IP 进行 CV 扫描,结果见图 2。由图 2 可知,3 种物质都有电化学活性,PHE 和 MR 在 0.6 V 左右出现一个不可逆的氧化峰,IP 在 0.1 V 左右出现一个不可逆的氧化峰,所以 3 种物质都可以用安培检测的方法测定。本实验选择检测电压为 0.950 V。

2.2 电泳条件的优化

2.2.1 缓冲溶液 pH 的影响

缓冲溶液的 pH 值是影响毛细管电泳分析的重

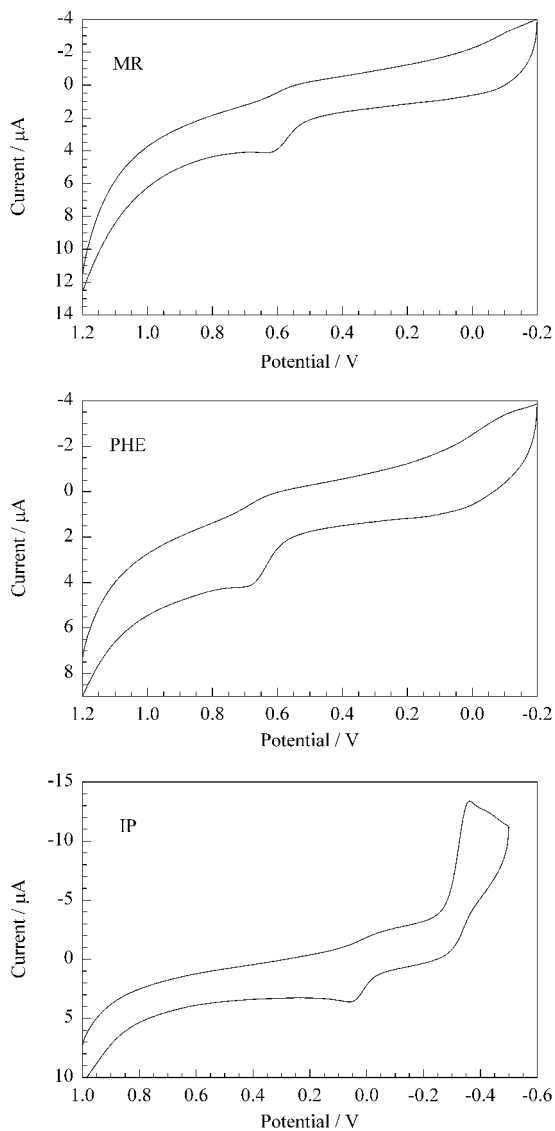


图 2 拟肾上腺素药物的循环伏安曲线
Fig. 2 Cyclic voltammograms of MR, PHE and IP

要因素之一。本实验考察了 pH 在 9.13 ~ 10.50 范围内的硼酸钠缓冲溶液(浓度均为 50 mmol/L)对 PHE、MR 和 IP 分离的影响,实验结果见图 3。由图 3 可见,当 pH 值小于 9.55 时,3 种拟肾上腺素药物的分离效果不好,尤其当 pH 值为 9.13 时,PHE 和 MR 的谱峰基本叠加在一起。随着 pH 值的增大,PHE 和 MR 可以得到较好的分离;但 pH 继续增大至 10.20 时,MR 和 IP 的分离效果变差,当 pH 值为 10.50 时,两者的谱峰完全叠加在一起。因此本实验选择缓冲溶液的 pH 为 10.00。

2.2.2 缓冲溶液浓度的影响

缓冲溶液的浓度会影响分析物的迁移时间,进而影响分离度。本实验考察了硼酸盐缓冲液浓度在 20 ~ 60 mmol/L 范围内 PHE、MR 和 IP 的分离情况,结果见图 4。由图 4 可知,当缓冲溶液的浓度小

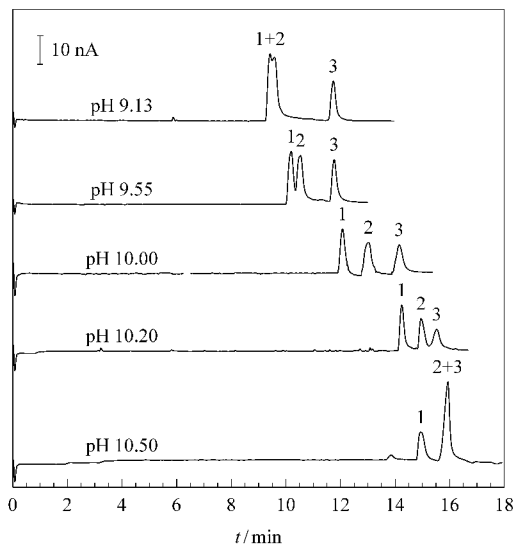


图 3 缓冲溶液 pH 值对 PHE、MR 和 IP 分离的影响
Fig. 3 Effect of pH of buffer on the separation of PHE, MR and IP

Conditions: concentrations of PHE, MR, IP, 0.1 mmol/L; working potential, +0.950 V (vs. Ag/AgCl); separation voltage, 18 kV; injection time, 10 s; running buffer, 50 mmol/L Na₂B₄O₇.

1. PHE; 2. MR; 3. IP.

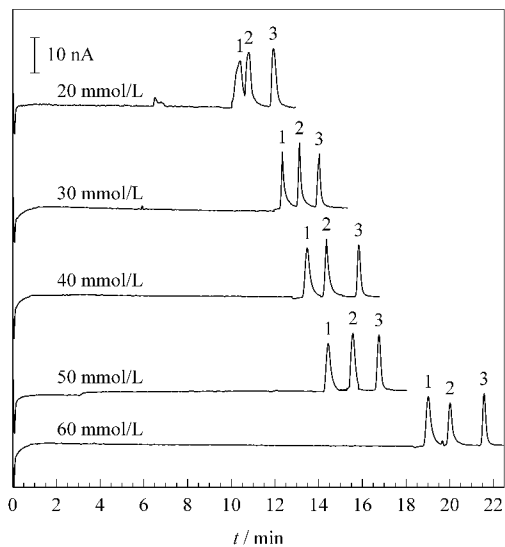


图 4 缓冲溶液浓度对 PHE、MR 和 IP 分离的影响
Fig. 4 Effect of buffer concentration on the separation of PHE, MR and IP

Conditions: concentrations of PHE, MR, IP, 0.1 mmol/L; working potential, +0.950 V (vs. Ag/AgCl); separation voltage, 18 kV; injection time, 10 s; running buffer, different concentrations of Na₂B₄O₇, pH 10.00.

1. PHE; 2. MR; 3. IP.

于 30 mmol/L 时,3 种物质的迁移时间较短,不能得到较好的分离。随着缓冲液浓度的增加,3 种物质得到较好的分离。但考虑缓冲液浓度太大时,峰出现展宽拖尾现象,故本实验选择硼酸盐缓冲液的浓度为 50 mmol/L。

2.2.3 分离电压的选择

分离电压决定电泳的电场强度、电渗流和电泳速度,是影响分离效率和迁移时间的重要因素。本实验考察了分离电压在 10~22 kV 范围内对 3 种分析物分离的影响,结果见图 5。结果表明,随着分离电压的逐渐增大,电渗流和分析物的电泳速度都增大,迁移时间缩短,但 PHE 和 MR 分离效果较差;分离电压在 10~18 kV 范围内,3 种分析物可以得到较好的分离。但分离电压太小时,IP 的谱峰展宽拖尾,所以本实验选择分离电压为 18 kV。

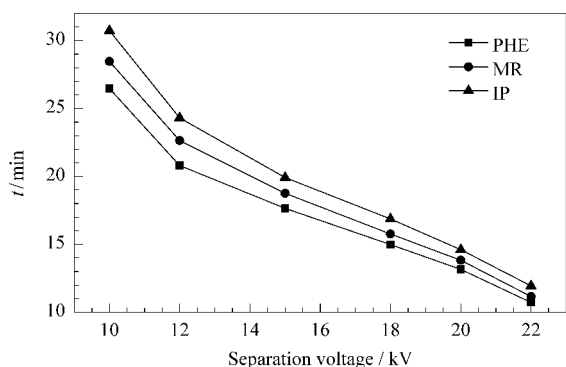


图 5 分离电压对 PHE、MR 和 IP 分离的影响

Fig. 5 Effect of separation voltage on the separation of PHE, MR and IP

Conditions: concentrations of PHE, MR, IP, 0.1 mmol/L; working potential, +0.950 V (vs. Ag/AgCl); injection time, 10 s; running buffer, 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 10.00.

2.2.4 进样时间的选择

在分离电压为 18 kV 条件下,在 5~15 s 范围内改变进样时间,考察进样时间对分离的影响。结果发现,随着进样时间的增加,进样量增加,峰电流也会增大。但进样时间太长,将使毛细管过载,从而引起峰展宽。在实验中,进样时间从 12 s 增加到 15 s,峰电流增加不明显,峰形展宽,所以本实验选择进样时间为 10 s。

2.2.5 重现性、线性关系与检出限

在优化的电泳条件下,对 PHE、MR、IP 混合标准溶液(浓度都为 0.1 mmol/L)进行重现性实验,结果见表 1。将同一份混合标准溶液连续进样 3 次,迁移时间和峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 0.72%~1.50% 和 5.63%~7.80%。

表 1 PHE、MR、IP 迁移时间和峰面积的相对标准偏差($n=3$)

Table 1 Reproducibilities of migration times and peak areas of PHE, MR, IP ($n=3$) %

Compound	Migration time	Peak area
PHE	0.72	5.63
MR	0.85	7.80
IP	1.50	6.85

在选定的实验条件下,对浓度范围为 2~100 $\mu\text{mol/L}$ (对应的质量浓度见表 2)的 3 种拟肾上腺素药物的混合标准溶液进行分析,考察峰面积(Y)与药物质量浓度(X)的线性关系以及分析物的检出限,结果见表 2。其中检出限是分析物的响应信号为噪声信号 3 倍时所对应的浓度。在最佳实验条件下 PHE、MR、IP 3 种物质的毛细管电泳谱图见图 6。

表 2 3 种拟肾上腺素药物的回归方程和检出限

Table 2 Regression equations and detection limits of PHE, MR and IP

Compound	Regression equation	r	Linear range/(g/L)	Detection limit/(g/L)
PHE	$Y = 6 \times 10^{10} X - 5547$	0.9999	0.41 - 20.4	0.16
MR	$Y = 4 \times 10^{10} X - 953$	0.9999	0.63 - 31.7	0.25
IP	$Y = 4 \times 10^{10} X - 10143$	0.9991	0.50 - 24.8	0.25

Y : peak area; X : mass concentration, g/L.

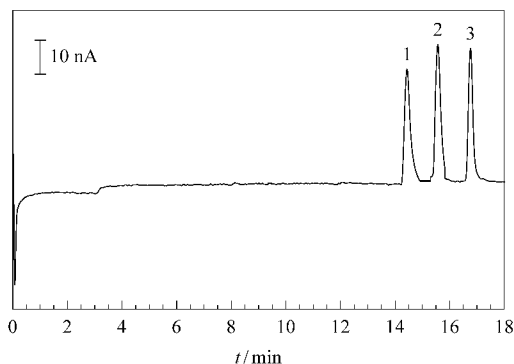


图 6 PHE、MR、IP 混合标准溶液的毛细管电泳谱图

Fig. 6 Electropherogram of a mixed solution of PHE, MR and IP standards

Conditions: concentrations of PHE, MR, IP, 0.1 mmol/L; working potential, +0.950 V (vs. Ag/AgCl); separation voltage: 18 kV; running buffer, 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 10.00; injection time, 10 s.

1. PHE; 2. MR; 3. IP.

2.3 样品测定

在最佳实验条件下,按 1.4 节所述方法对市售的 PHE 和 MR 针剂样品进行毛细管电泳测定。为了验证方法的准确性,同时进行了加标回收实验,对每个针剂平行测定 2 个样品,加标水平均为 10 g/L,回收率为 96.4%~109.6%,测定结果见表 3。图 7 是 PHE 针剂的毛细管电泳谱图。

表 3 PHE 和 MR 针剂的测定($n=3$)

Table 3 Determination of the samples ($n=3$)

Injection drug	Original/(g/L)	Added/(g/L)	Found/(g/L)	Recovery/%	RSD/%
PHE	10.00	10.00	9.99	99.9	5.2
		10.00	9.64	96.4	4.5
MR	10.00	10.00	10.69	106.9	3.5
		10.00	10.96	109.6	2.9

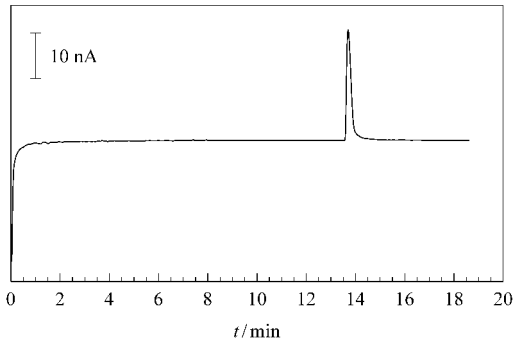


图 7 PHE 针剂的毛细管电泳谱图

Fig. 7 Electropherogram of a PHE injection

3 结语

本文建立了毛细管电泳-安培检测法分离检测去氧肾上腺素、重酒石酸间羟胺、盐酸异丙肾上腺素 3 种拟肾上腺素药物的方法。在优化的实验条件下, 3 种物质在 18 min 内达到基线分离。所建立的方法可应用于针剂样品的分析。

参考文献:

[1] Jin Y Y. Pharmacology. Beijing : People 's Medical Press (金有豫. 药理学. 北京 : 人民卫生出版社), 2001 : 39

- [2] Yao H , Sun Y , Lin X , et al. Luminescence , 2006 , 21(2) : 112
- [3] Georgiou C A , Koupparis M A. Analyst , 1990 , 115(3) : 309
- [4] Liu H , Feng F , Ma M , et al. J Chromatogr B , 2007 , 858 : 42
- [5] Xu B J , Zhang D T , Shen B C , et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (徐贝佳 , 张大同 , 沈报春 , 等. 分析化学) , 2007 , 35(1) : 55
- [6] Abdolraouf S M , Seyed K H N D. Spectrochim Acta , Part A , 2010 , 75(4) : 1270
- [7] Huang F , Jin G , Liu Y , et al. Talanta , 2008 , 74(5) : 1435
- [8] Wang C Q , Wang H , Liu Y M. Chinese Chemical Letters , 2007 , 18(4) : 452
- [9] Cheng H , Wu J H , Chen R S , et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (程寒 , 吴剑虹 , 陈荣生 , 等. 分析化学) , 2008 , 36(1) : 1
- [10] Gomez M R , Olsina R A , Martínez L D , et al. J Pharm Biomed Anal , 2002 , 30 : 791
- [11] Wei S , Song G , Lin J M. J Chromatogr A , 2005 , 1098 : 166
- [12] Gallego J M L , Arroyo J P. J Sep Sci , 2003 , 26(9) : 947
- [13] Wang Z , Sun Y , Sun Z. J Chromatogr A , 1996 , 735 : 295
- [14] Mikuš P , Valášková I , Havránek E. J Pharm Biomed Anal , 2003 , 33(2) : 157
- [15] Wang H , Gu J L , Hu H F , et al. Anal Chim Acta , 1998 , 359 : 39
- [16] Hedeland Y , Haglöf J , Beronius P , et al. Electrophoresis , 2006 , 27(22) : 4469
- [17] Servais A C , Chiap P , Hubert P , et al. Electrophoresis , 2004 , 25(10) : 1632